

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АМИЛОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Н. Л. Бруслик¹, А. Р. Каюмов¹, М. И. Богачев², Д. Р. Яруллина¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

²Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет
«ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина), Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 20.09.2012 г.

Аннотация. Расшифровка геномных детерминант гидролиза крахмала создала базу для предсказания этой способности у клинически и биотехнологически важных бактерий родов *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* и *Lactobacillus*, основываясь на анализе *in silico*. В настоящей работе, сопоставив данные компьютерного скрининга генов α -амилаз в геномах данных микроорганизмов с результатами экспериментальной оценки у них крахмал-гидролизующей активности, мы показали, что регистрируемая амилазная активность является результатом сложного преобразования генетической программы клетки и, следовательно, присутствие гена амилазы не всегда гарантирует его высокую экспрессию.

Ключевые слова: грамположительные бактерии, амилолитическая активность, α -амилаза, BLAST, гомология.

Abstract. As the genomic determinants of starch hydrolysis were identified, it became possible to predict this property in clinically and biotechnologically significant bacteria of genera *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* and *Lactobacillus* on the basis of *in silico* analysis. Data of computer screening of alpha-amylase gene in genomes of these microorganisms were compared with the experimentally determined amylolytic activity to show that the observed amylase activity is due to a complex transformation of the genetic program of the cell and therefore alpha-amylase gene alone does not guarantee its high expression.

Keywords: Gram-positive bacteria, amylolytic activity, alpha-amylase, BLAST, homology.

α -Амилазы (Е.С. 3.2.1.1) – семейство гидролитических ферментов, расщепляющих крахмалы до простых сахаров. Они часто обнаруживаются у микроорганизмов, поэтому последние стали распространенным биотехнологическим источником амилаз для промышленности, клинической практики и научных исследований [1]. Ген α -амилазы (*amy*) достаточно полно охарактеризован; он был неоднократно клонирован и экспрессирован в *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* [2-4].

Поиск новых продуцентов амилаз представляет собой селекцию амилолитически активных представителей среди вновь выделенных либо мутантных штаммов микроорганизмов. Постгеномная эра развития науки позволяет предсказать ферментативную активность новых изолятов без трудоемкого скрининга классическими методами

микробиологии. Тем не менее, присутствие гена амилазы не всегда означает его высокую экспрессию ввиду различных механизмов регуляции активности генов.

В настоящей работе была исследована амилолитическая активность бактерий *in silico* и полученные результаты сопоставлены с данными экспериментальной оценки крахмал-гидролизующей активности штаммов.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объект исследования. Объектом исследования служили бактерии, представленные в табл. 1. Определение принадлежности выделенных из различных источников бактерий к роду *Lactobacillus* проводили по ГОСТ 10444.11-89 «Продукты пищевые. Методы обнаружения молочнокислых микроорганизмов»: по отношению к окраске по Граму, подвижности, наличию спорообразования и каталазы.

© Бруслик Н. Л., Каюмов А. Р., Богачев М. И., Яруллина Д. Р., 2014

Биоинформатика. Поиск гомологичных последовательностей в базе данных GenBank [8] осуществляли с помощью программы BLAST [9] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Амилолитическая активность. Для выявления амилолитической активности использовали плотные питательные среды: MRS (Merck) - для лактобацилл и Лоурия-Бертони (LA) - для остальных бактерий, в которые вносили 1% водорастворимый картофельный крахмал. Исследуемые микроорганизмы высевали штрихом на чашки Петри и инкубировали при 37 °С в течение 2 – 5 суток. Гидролиз крахмала обнаруживали по бесцветным зонам вокруг штриха (колоний) после обработки агаровой пластины раствором Люголя. Среда, содержащая крахмал, окрашивалась в синий цвет (рис. 1).

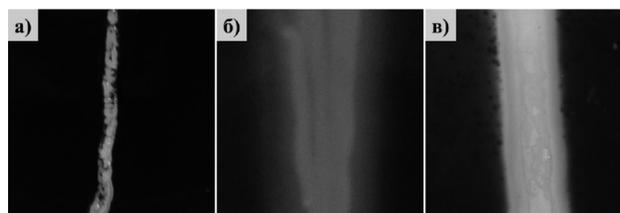


Рис. 1. Колонии бактерий *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 (а), *Bacillus* sp. (б) и *E. coli* (в) на плотной питательной среде, содержащей 1% растворимого картофельного крахмала. Чашки обработаны раствором Люголя для демонстрации зон гидролиза крахмала у *Bacillus* sp. (б) и *E. coli* (в) и отсутствия таковых у *L. plantarum* 8P-A3 (а).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Амилазы микробного происхождения имеют большое биотехнологическое и клиническое зна-

Таблица 1.

Штаммы микроорганизмов, используемые в работе

№	Штамм	Источник (коллекция)
1	<i>Bacillus subtilis</i> 168	Университет г. Тюбингена, Германия [5]
2	<i>Bacillus</i> sp.	Коллекция микроорганизмов кафедры микробиологии КФУ (г. Казань, РФ)
3	<i>Staphylococcus aureus</i>	Коллекция микроорганизмов кафедры микробиологии КФУ (г. Казань, РФ)
4	<i>Micrococcus</i> sp.	Коллекция микроорганизмов кафедры микробиологии КФУ (г. Казань, РФ)
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> B578	Всероссийская коллекция микроорганизмов
6	<i>Lactobacillus plantarum</i> 8P-A3	Препарат «Лактобактерин сухой» (ФГУП НПО «Биомед») [6]
7	<i>Lactobacillus acidophilus</i> n.v. Ep 317/402	БАД «Наринэ» (ОАО «Narex», Армения)
8	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> 51	Лекарственный препарат «Гастрофарм» (АО «Биовет», Болгария)
9	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Питьевой йогурт «Вю Баланс» (ОАО Юнимилк)
10	<i>Lactobacillus casei imunitass</i>	Напиток кисломолочный «Actimel» (фирма Danon)
11	<i>Lactobacillus</i> sp. 1	Питьевой йогурт «Нежный» (ООО Кампина)
12	<i>Lactobacillus</i> sp. 2	Питьевой йогурт «Простоквашино» (ОАО Юнимилк)
13	<i>Lactobacillus</i> sp. 3	Питьевой йогурт (ОАО Вамин Татарстан)
14	<i>Lactobacillus</i> sp. 4	Питьевой йогурт «Тема» (ОАО Юнимилк)
15	<i>Lactobacillus</i> sp. 5	Кисломолочный напиток «Айран» (ООО Фуд Милк)
16	<i>Lactobacillus</i> sp. 6	Кисломолочный напиток «Дар гор» (ООО Фуд Милк)
17	<i>Lactobacillus</i> sp. 7	Кисломолочный напиток «Ацидофилин» (ОАО Вамин Татарстан)
18	<i>Lactobacillus</i> sp. 8	Кисломолочный напиток «Тан» (ООО Продукт «Чистая линия»)
19	<i>Lactobacillus</i> sp. 9	Катык «Васькино счастье» (ОАО ЗМК)
20	<i>Lactobacillus</i> sp. 10	Простокваша Мечниковская (ОАО Вамин Татарстан)
21	<i>Lactobacillus</i> sp. 11	Ряженка 2,5% (ООО Торговый Дом «Наш Продукт»)
22	<i>Lactobacillus</i> sp. 12	Ряженка «Домик в деревне» (ОАО Вимм-Биль-Данн)
23	<i>Lactobacillus</i> sp. 13	Ряженка 4% (ОАО Чистое поле)
24	<i>Escherichia coli</i> DH5α	Университет г. Тюбингена, Германия [7]

чение. Бактерии рода *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. steaerothermophilus*, *B. licheniformis* и *B. amyloliquefaciens*) - высоко активные продуценты α -амилазы, поэтому они часто используются в коммерческом производстве фермента [1]. Амилолитические лактобациллы играют важную роль в пищевой промышленности, основанной на ферментации маниоки и зерновых [10, 11]. Амилазная активность микроорганизмов-симбионтов организма человека может иметь клиническое значение в таких процессах, как, например, гидролиз крахмала кишечной микрофлорой [12] или ингибирование образования биопленок у патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* под действием α -амилазы бацилл [13]. Таким образом, разработка простого и эффективного биоинформационного метода экспресс-оценки амилолитической активности у

микроорганизмов этих групп представляет собой актуальную задачу.

С помощью алгоритма BLAST на генетическом уровне была рассмотрена потенциальная возможность проявления амилазной активности у грамположительных бактерий четырех родов: *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* и *Lactobacillus*, геномы которых доступны в базе данных GenBank. В качестве запроса при скрининге использовали аминокислотную последовательность α -амилазы *Bacillus subtilis* (NP_388186.2), поскольку она является одной из наиболее полно охарактеризованных микробных амилаз. У всех проанализированных бактерий идентифицированы гены, кодирующие α -амилазы, однако степень их гомологии с ферментом *B. subtilis* сильно варьирует даже внутри рода *Bacillus* (от 0 до 93% гомологии) (табл. 2).

Таблица 2.

α -Амилазы исследуемых грамположительных бактерий, гомологичные α -амилазе *B. subtilis* (NP_388186.2)

№	Микроорганизм	Регистрационный номер белка в GenBank	Перекрытие белков, %	Идентичность, %	Гомология, %
1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	YP_001419958.1	100	87	93
2	<i>Bacillus cereus</i>	ADH93707.1	100	87	93
3	<i>Bacillus licheniformis</i>	BAL45509.1	25	39	25
4	<i>Bacillus anthracis</i> str. A0442	ZP_02392073.1	29	24	40
5	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061	ZP_03054701	0	0	0
6	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 14.1.R1.SE	ZP_12939068.1	23	23	41
7	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> COL	YP_185405.1	49	20	24
8	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> IS-250	ZP_14295253.1	48	20	26
9	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> JKD6159	YP_005739582.1	42	23	23
10	<i>Micrococcus luteus</i> SK58	ZP_06502108.1	17	29	43
11	<i>Lactobacillus plantarum</i>	AAC45780.1	97	50	63
12	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC14917	ZP_07076768.1	25	25	40
13	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ZJ316	YP_007413067.1	25	25	40
14	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> JDM1	YP_003061754.1	25	25	40
15	<i>Lactobacillus casei</i> W56	YP_006752222.1	28	25	40
16	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LMS2-1	ZP_04441904.1	32	24	39
17	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM20072	ZP_16891044.1	59	22	38
18	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ND02	YP_004034674.1	59	22	38

Среди проанализированных видов лактобацилл наибольшим сходством с α -амилазой *B. subtilis* обладает фермент *L. plantarum*, при этом идентичность и гомология составляют 50 и 63%, соответственно. Амилазы стафило- и микрококков, а также остальных взятых для анализа лактобацилл демонстрируют 20–40% гомологии с референтным белком. Таким образом, данные биоинформатики указывают на вариабельность последовательности α -амилазы внутри родов, при этом гомология α -амилаз внутри всех исследованных видов бактерий, кроме *L. plantarum*, составляет 90–95% (табл. 2).

Чтобы оценить прогностический потенциал биоинформационного подхода мы провели экспериментальный анализ амилолитической активности у бактерий, α -амилазы которых обладали разной степенью гомологии с этим ферментом *B. subtilis*. Оба использованных в работе штамма *L. plantarum*, несмотря на наличие близких гомологов α -амилазы *B. subtilis* в геноме, были не способны разлагать картофельный крахмал, входящий в состав среды культивирования (рис. 1а, табл. 3). Остальные 17 исследованных штаммов лактобацилл и бактерии *S. aureus* также не проявляли ферментативную активность, при этом демонстрировали невысокую гомологию с *amy B. subtilis* (20–40%). Напротив, микрококки на 5 сутки культивирования проявляли амилолитическую активность, несмотря на достаточно низкую гомологию фермента (43%).

Амилолитическая активность бацилл (рис. 1б, табл. 3) согласуется с наличием в их геномах гена α -амилазы. Однако отметим, что исследованные в работе штаммы *Bacillus* осуществляли лишь частичный гидролиз крахмала до мальтодекстрина, о чем свидетельствуют красно-бурые зоны вокруг колоний после проявления их раствором Люголя (рис. 1б).

Таблица 3

Амилолитическая активность микроорганизмов

№	Микроорганизм	Амилолитическая активность		
		1 сут.	3 сут.	5 сут.
1	<i>Bacillus subtilis</i> 168	–	+	+
2	<i>Bacillus</i> sp.	–	–	+
3	<i>Staphylococcus aureus</i>	–	–	–
4	<i>Micrococcus</i> sp.	–	–	+
5	19 использованных в работе штаммов <i>Lactobacillus</i>	–	–	–

(+) – присутствует; (–) – отсутствует.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, решающее значение для подтверждения способности того или иного микроорганизма разлагать крахмал имеет не наличие гена α -амилазы в его геноме, а экспериментальное обнаружение амилазной активности. Данное наблюдение находится в русле современной концепции [14] о приоритете функциональной активности белков над их генетической программой и обуславливает важность разработки экспресс-методов оценки экспрессии амилаз в микробных клетках.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (Соглашение № 14.В37.21.2080 от 14.11.2012).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pandey A. Advances in microbial amylases / A.Pandey [et al.] // *Biotechnol. Appl. Biochem.* — 2000. — V. 31. — P. 135–152.
- Bahl H. α -Amylase of *Clostridium thermosulfurogenes* EM1: nucleotide sequence of the gene, processing of the enzyme, and comparison to other α -amylases / H.Bahl [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1991. — V. 57. — P. 1554–1559.
- Satoh E. Molecular cloning and expression of two alpha-amylase genes from *Streptococcus bovis* 148 in *Escherichia coli* / E.Satoh [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1993. — V. 59, N. 11. — P. 3669–3673.
- Shahhoseini M. Expression and secretion of an alpha-amylase gene from a native strain of *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli* by T7 promoter and putative signal peptide of the gene / M.Shahhoseini, A.A.Ziaee, N.Ghaemi // *J. Appl. Microbiol.* — 2003. — V. 95, N. 6. — P. 1250–1254.
- Kayumov A. Inactivation of the general transcription factor TnrA in *Bacillus subtilis* by proteolysis / A.Kayumov [et al.] // *Microbiology.* — 2008. — V. 154, N. 8. — P. 2348–2355.
- Яруллина Д.Р. Альтернативные пути образования оксида азота у лактобацилл: обнаружение возможной NO-синтазной активности методом ЭПР / Д.Р.Яруллина [et al.] // *Микробиология.* — 2006. — Т. 75, № 6. — С. 731–736.
- Kayumov A. Interaction of the general transcription factor TnrA with the PII-like protein GlnK and glutamine synthetase in *Bacillus subtilis* / A.Kayumov [et al.] // *FEBS J.* — 2011. — V. 278. — P. 1779–1788.

8. Benson D.A. Genbank / D.A.Benson [et al.]// Nucleic Acids Res. — 1999. — V. 27. — P. 12-17.
9. Altschul S.F. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs / S.F.Altshul [et al.] // Nucleic Acids Res. 1997. — V. 25. — P. 3389-3402.
10. Sanni A.I. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods / Sanni A.I., Morlon-Guyot J., Guyot J.P. // Int. J. Food Microbiol. — 2002. — V. 72, N. 1-2. — P. 53-62.
11. Huch Нйе Kostinek M. Use of *Lactobacillus* strains to start cassava fermentations for Gari production / M. Huch Нйе Kostinek [et al.] // Int. J. Food Microbiol. — 2008. — V. 128, N. 2. — P. 258-267.
12. Wang X. In vitro utilization of amylopectin and high-amylose maize (amylo maize) starch granules by human colonic bacteria / X.Wang [et al.] // Appl. Env. Microbiol. — 1999. — V. 65, N. 11. — P. 4848–4854.
13. Kalpana B.J. Antibiofilm activity of α -amylase from *Bacillus subtilis* S8-18 against biofilm forming human bacterial pathogens / B.J.Kalpana, S.Aarthy, S.K.Pandian // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2012. — V. 167, N. 6. — P. 1778-1794.
14. Свездлов Е.Д. Микробиология генома / Е.Д.Свездлов // Молекулярная биология. — 1999. — Т. 33. — С. 917-940.

Бруслик Наталия Леонидовна — аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета; e-mail: apus_apus@inbox.ru

Bruslick Natalia L. — Post graduate student of Microbiology Department, Kazan Federal University; e-mail: apus_apus@inbox.ru

Каюмов Айрат Рашитович — кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики Казанского (Приволжского) федерального университета; e-mail: kairatr@yandex.ru;

Kayumov Airat R. — PhD (Biology), Associate professor of Genetics Department, Kazan Federal University; e-mail: kairatr@yandex.ru;

Богачев Михаил Игоревич — кандидат технических наук, доцент кафедры радиосистем Санкт-Петербургского государственного электротехнического университета «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина); e-mail: rogex@mail333.com;

Bogachev Michael I. — Dr., Associate professor of Radiosystems Department of Saint Petersburg Electrotechnical University «LETI» e-mail: rogex@mail333.com

Яруллина Дина Рашидовна — кандидат биологических наук, доцент преподаватель кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета; e-mail: kasfes@gmail.com.

Yarullina Dina R. — PhD (Biology), Associate professor of Microbiology Department, Kazan Federal University; e-mail: kasfes@gmail.com.